# ภาคผนวก ก

**Minimal inhibitory concentration**

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ หน่วยที่ใช้โดยทั่วไป คือ μg/ml ค่า MIC นี้สามารถนำไปใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความไวของเชื้อหนึ่ง ๆ ต่อยาสมุนไพรหลาย ๆ ชนิดหรือความไวของเชื้อหลายชนิดต่อยาหนึ่ง ๆ ในการทดสอบเพื่อหาค่า MIC นั้นควรทำการเจือจางยาให้มีความเข้มข้นลดลงทุกสองเท่า (serial 2-fold dilution) ไปเรื่อย ๆ ตามความต้องการ

**Minimal bactericidal concentration**

เป็นความเข้มข้นต่ำสุดของยาที่สามารถทำลายหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ 99.9%

**McFarland standard**

ใช้สำหรับปรับความขุ่นของเชื้อให้ได้ปริมาณตามความต้องการที่จะใช้ทดสอบ

วิธีเตรียม

นำ $H_2SO_4$ 1% 0.5 ml ผสมกับ $BaCl_2.2H_2O$ 1.175% 99.5 ml ใน volumetric flask เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตะกอนขาวขุ่นของ $BaSO_4$

**ตาราง ก** ส่วนผสมของ 0.048 M $BaCl_2$ (1.175% w/v $BaCl_2.2H_2O$) และ 0.36 $NH_2SO_4$ (1% v/v $H_2SO_4$) เพื่อเตรียม $BaSO_4$ standard หรือ McFarland standard หมายเลขต่างๆ

| Tube no. | 0.5 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $BaCl_2$ (ml) | 0.05 | 0.1 | 0.2 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.7 | 0.8 | 0.9 | 1.0 |
| $H_2SO_4$ (ml) | 9.95 | 9.9 | 9.8 | 9.7 | 9.6 | 9.5 | 9.4 | 9.3 | 9.2 | 9.1 | 9.0 |
| Approx. cell density ($x10^8$/ml) | 1.5 | 3 | 6 | 9 | 12 | 15 | 18 | 21 | 24 | 27 | 30 |

**Potassium phosphate buffer** 0.04 M pH 6.8

ส่วนประกอบ $KH_2PO_4$ 0.2 M 50 ml

NaOH 0.2 M 22.4 ml

Distilled water 127.6 ml

วิธีเตรียม นำ $KH_2PO_4$ 0.2 M และ NaOH 0.2 M มาผสมรวมกันแล้วเติมน้ำให้ครบปริมาตรตามต้องการ ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 นำสารที่ได้ไปเจือจางในอัตราส่วน 1:5 จะได้ phosphate buffer pH 6.8 ที่มีความเข้มข้น 0.04 M

การคำนวณการเตรียม $KH_2PO_4$ 0.2 M และ NaOH 0.2 M คือ

- เตรียม $KH_2PO_4$ 0.2 M โดย $KH_2PO_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 136.09 g/mol

ประกอบด้วย $KH_2PO_4$ 27.218 g

Distilled water 1000 ml

- เตรียม NaOH 0.2 M โดย NaOH มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 40 g/mol

ประกอบด้วย NaOH 8 g

Distilled water 1000 ml

**สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟต**

ในการทดลองจะต้องใช้ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0, 1.5 และ 3.0 M โดยใช้ phosphate buffer 0.04 M pH 6.8 เป็นตัวทำละลาย

- เตรียมสารละลาย $(NH_4)_2SO_4$ 3.0 M โดย $(NH_4)_2SO_4$ มีมวลโมเลกุลเท่ากับ 132.14 g/mol

ประกอบด้วย $(NH_4)_2SO_4$ 396.42 g

Phosphate buffer 1000 ml

- เตรียม $(NH_4)_2SO_4$ 1.5 M โดยทำการเจือจางจาก 3.0 M ในอัตราส่วน 1:2
- เตรียม $(NH_4)_2SO_4$ 1.0 M โดยทำการเจือจางจาก 3.0 M ในอัตราส่วน 1:3
- เตรียม $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 M โดยทำการเจือจางจาก 1.0 M ในอัตราส่วน 1:2
- เตรียม $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 M โดยทำการเจือจางจาก 1.0 M ในอัตราส่วน 1:10

**Mueller-Hinton agar (MHA)**

| | | |
|---|---|---|
| ส่วนประกอบ | Beef extract | 300.0 g |
| | Casamino acids technical | 17.5 g |
| | Starch | 1.5 g |
| | Agar | 12.0 g |
| | Distilled water | 1000 ml |

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 38.0 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนให้ส่วนผสมเข้ากันด้วย magnetic stirrer ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

**Mueller-Hinton broth (MHB)**

| | | |
|---|---|---|
| ส่วนประกอบ | Beef extract | 300.0 g |
| | Bacto casamino acids technical | 17.5 g |
| | Bacto soluble starch | 1.5 g |
| | Distilled water | 1000 ml |

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 21 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml คนด้วย magnetic stirrer ใช้ความร้อนน้อยๆ ให้ส่วนผสมเข้ากันดี แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

**Nutrient agar (NA)**

| | | |
|---|---|---|
| ส่วนประกอบ | Peptones from meat | 5.0 g |
| | Meat extract | 3.0 g |
| | Agar | 3.0 g |
| | Distilled water | 1000 ml |

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 20 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ต้มให้เดือดโดยใช้ hot plate พร้อมทั้งคนด้วย magnetic stirrer แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

**Tryptic soy broth (TSB)**

| | | |
|---|---|---|
| ส่วนประกอบ | Pancreatic digest of casein | 17.0 g |
| | Enzymatic digest of soybean meal | 3.0 g |
| | Dextrose | 2.5 g |
| | Sodium chloride | 5.0 g |
| | Dipotassium phosphate | 2.5 g |
| | Distilled water | 1000 ml |

วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 30 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนด้วย magnetic stirrer ให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

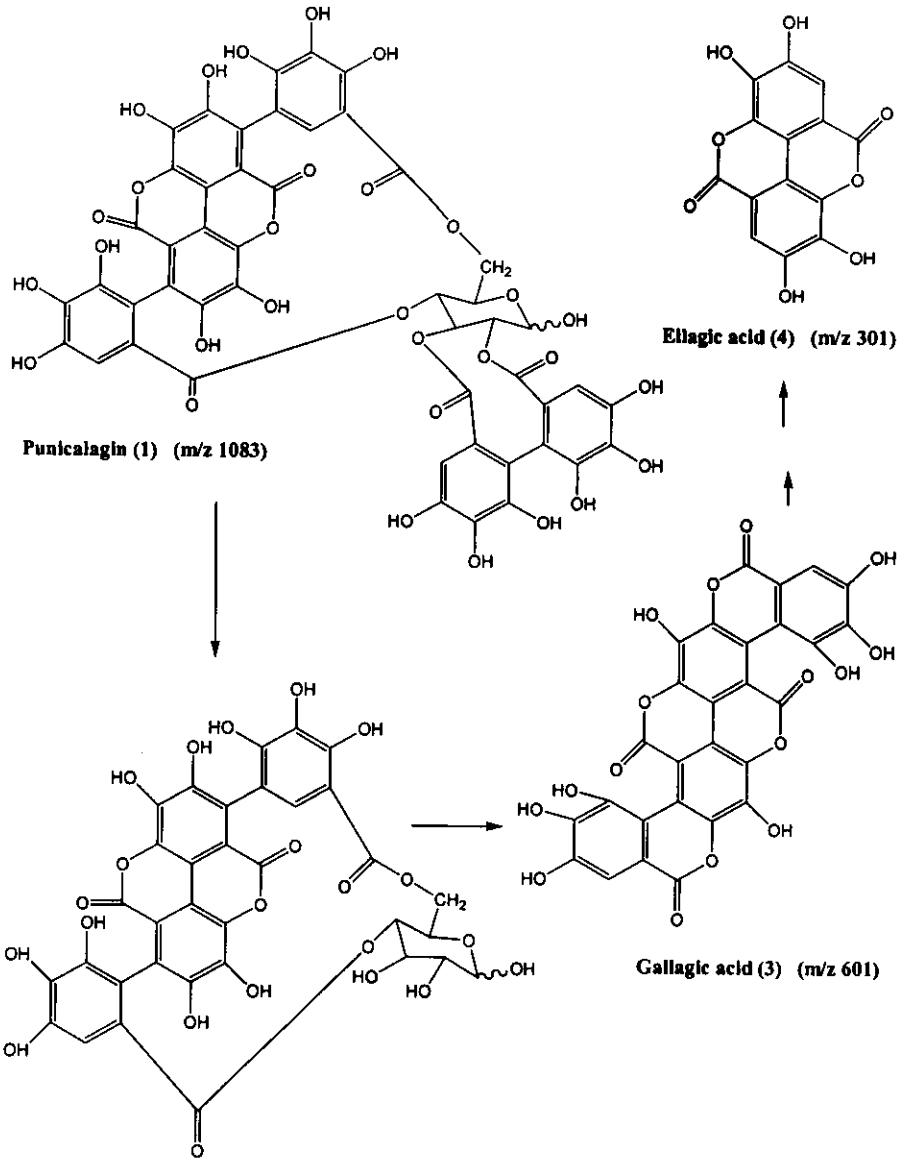
**Sorbitol-MacConkey agar (SMAC)**

| | | |
|---|---|---|
| ส่วนประกอบ | Peptone | 20 g |
| | Sorbitol | 10 g |

| | |
|---|---|
| Bilesalt No. 3 | 1.5 g |
| Sodium chloride | 5 g |
| Neutral red | 0.03 g |
| Crystal violet | 0.001 g |
| Agar | 15 g |
| Distilled water | 1000 ml |

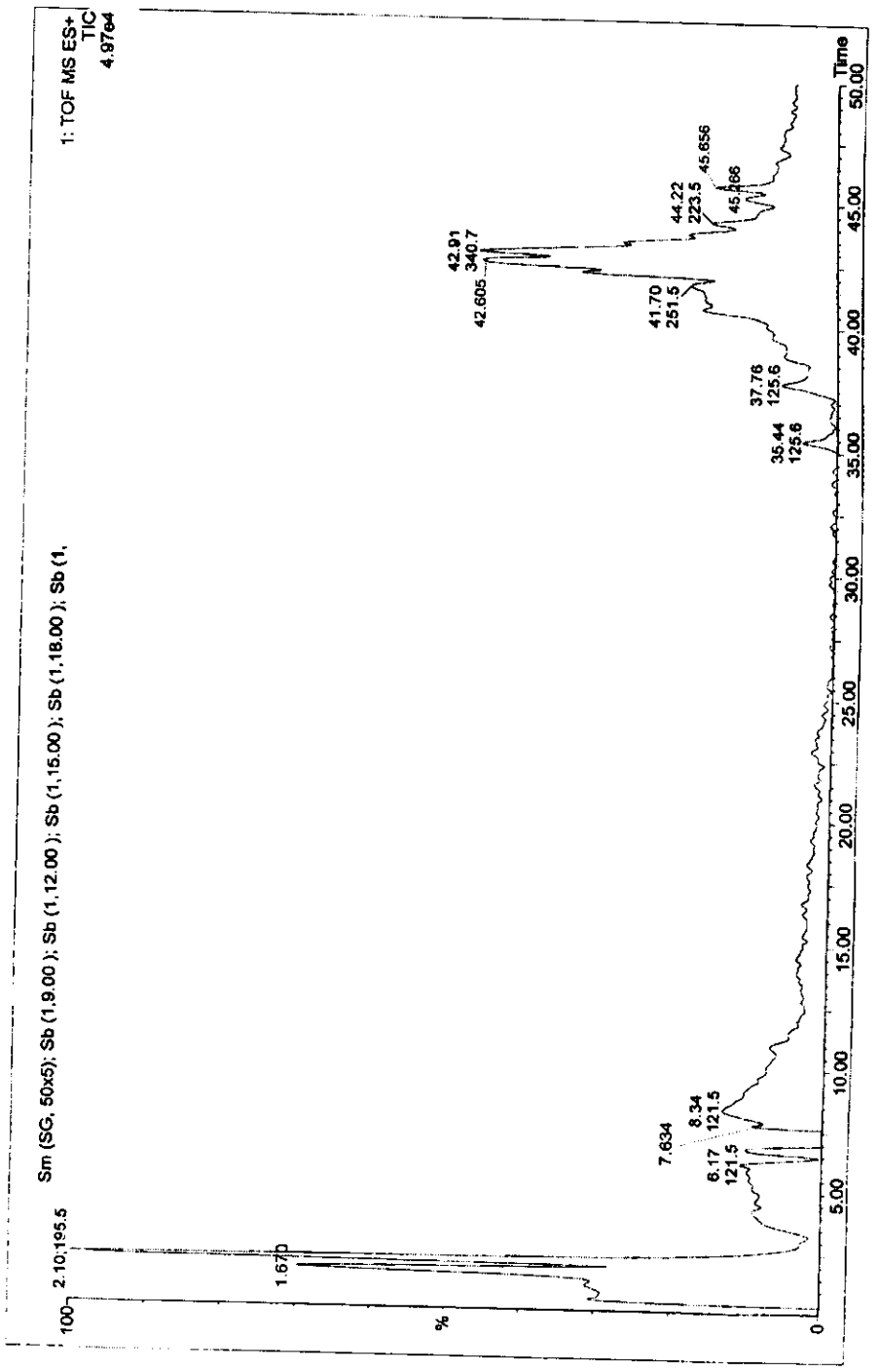
วิธีเตรียม ชั่งอาหาร 25.8 g ต่อน้ำกลั่น 1000 ml ให้ความร้อนพร้อมทั้งคนด้วย magnetic stirrer ให้ส่วนผสมเข้ากัน แล้วทำให้ปราศจากเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

# ภาคผนวก ข

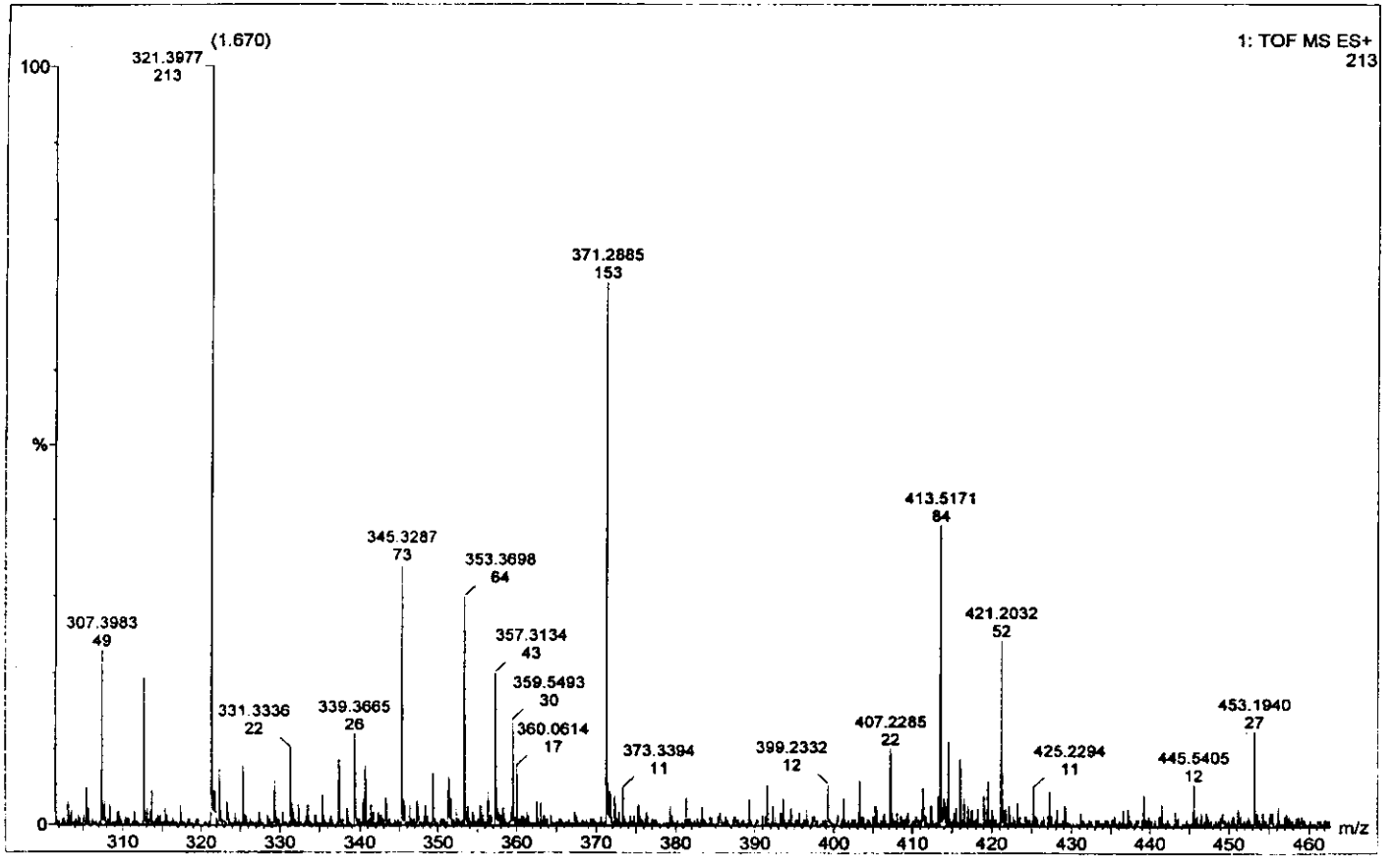



สูตรโครงสร้างของสารสำคัญในเปลือกผลทับทิม

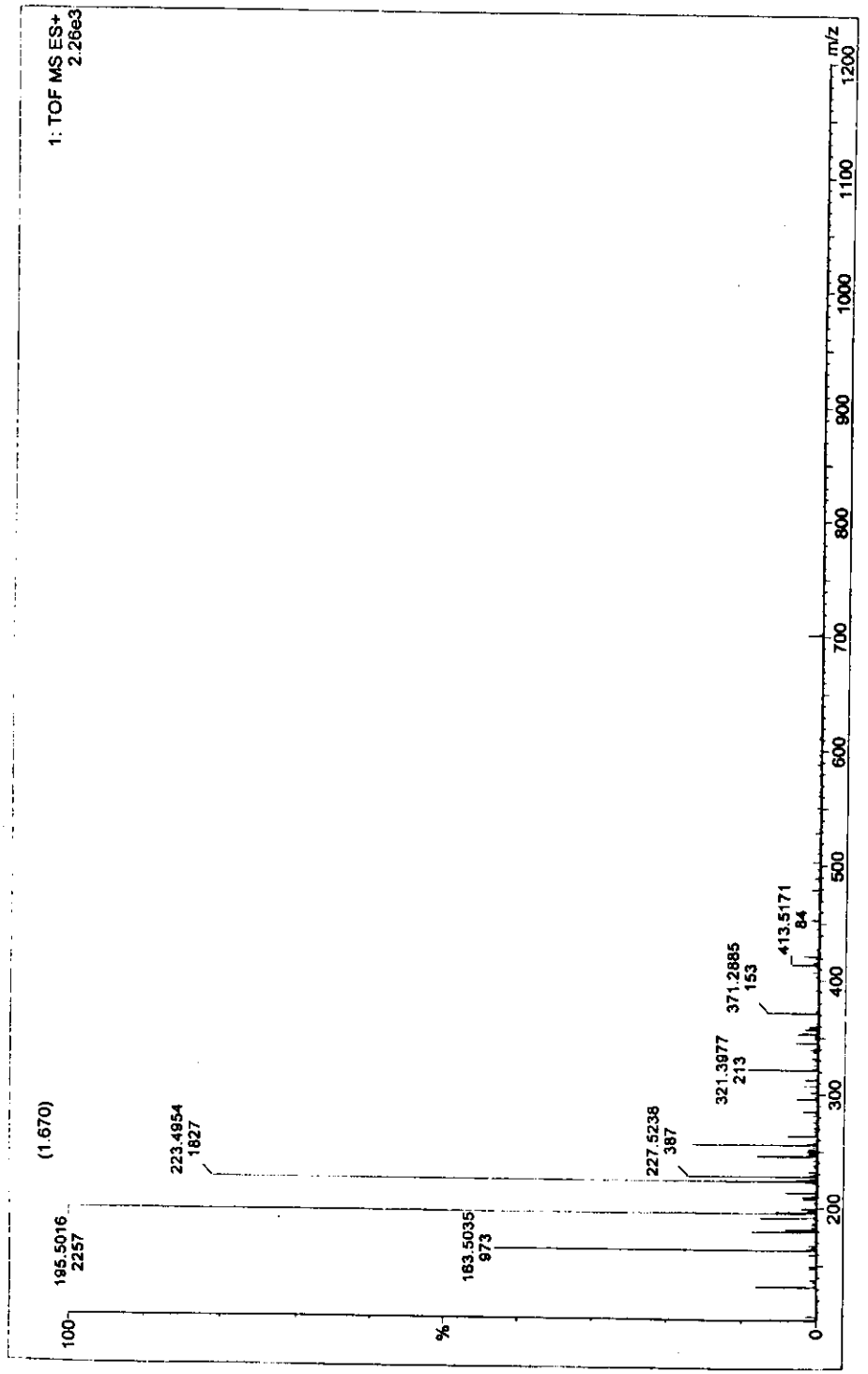
ที่มา : Seeram (2004)



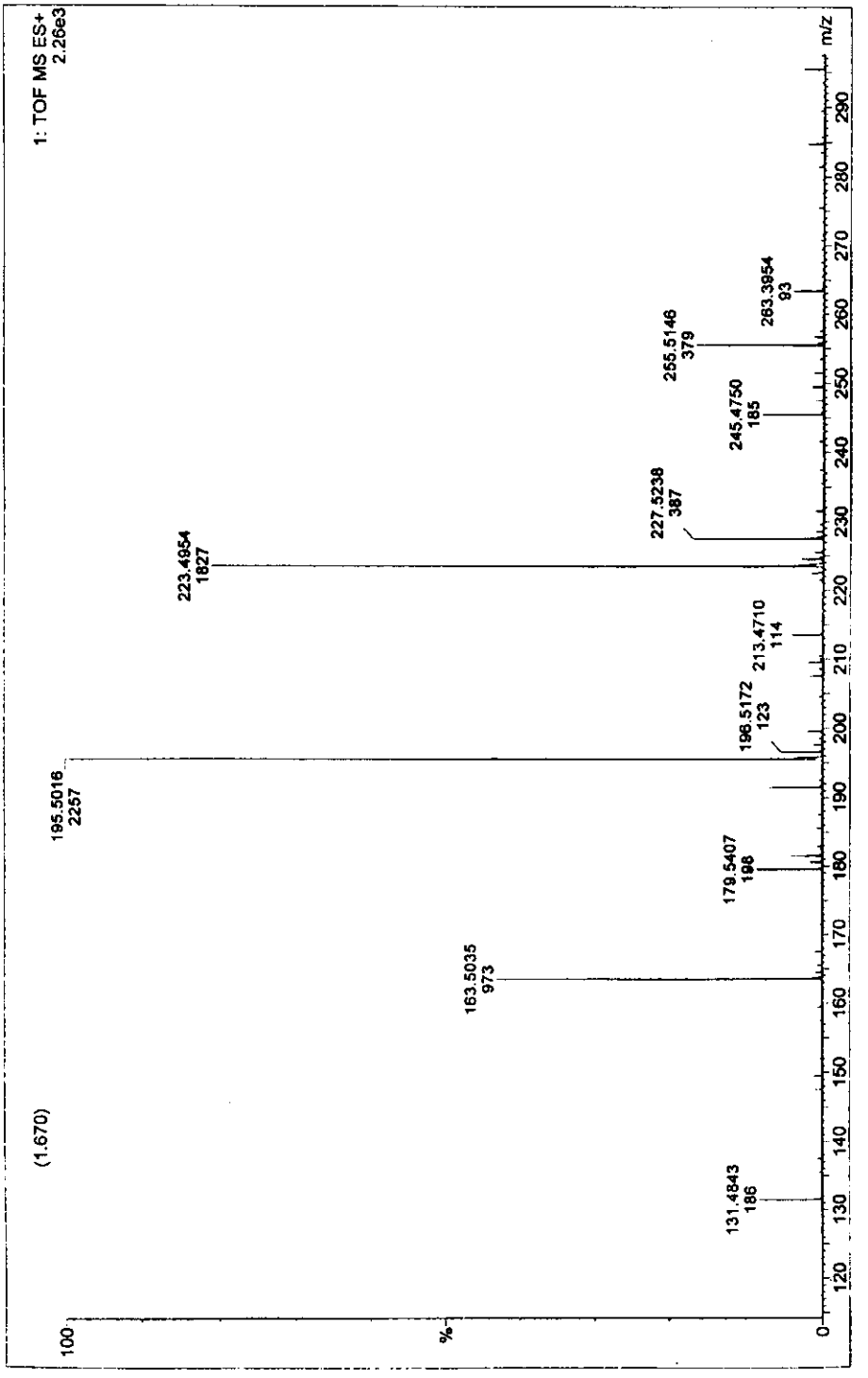

รูปที่ 1 LC ของ Ethyl acetate fraction



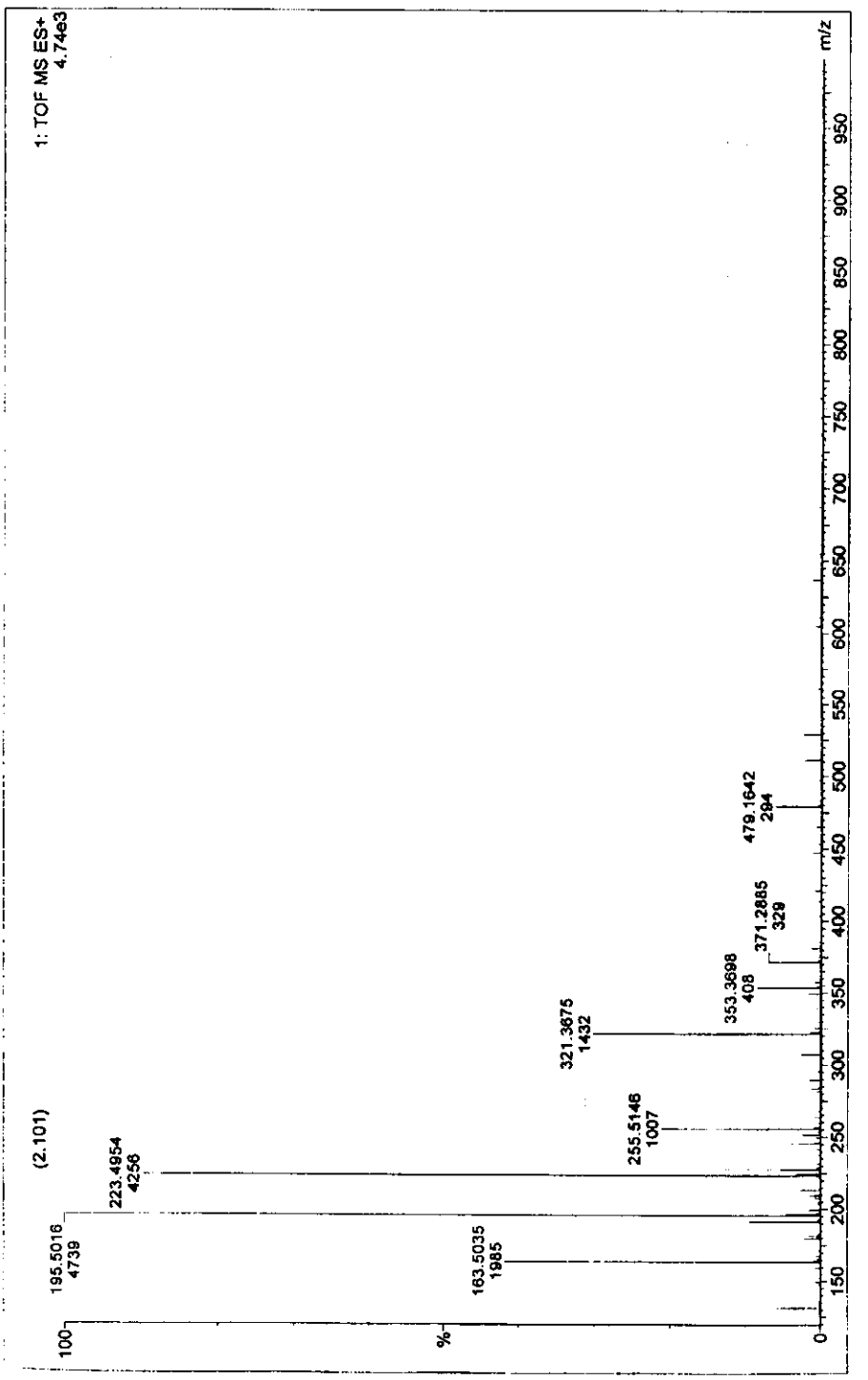

**รูปที่ 2.1** MS (m/z) ที่ 1.670 นาที



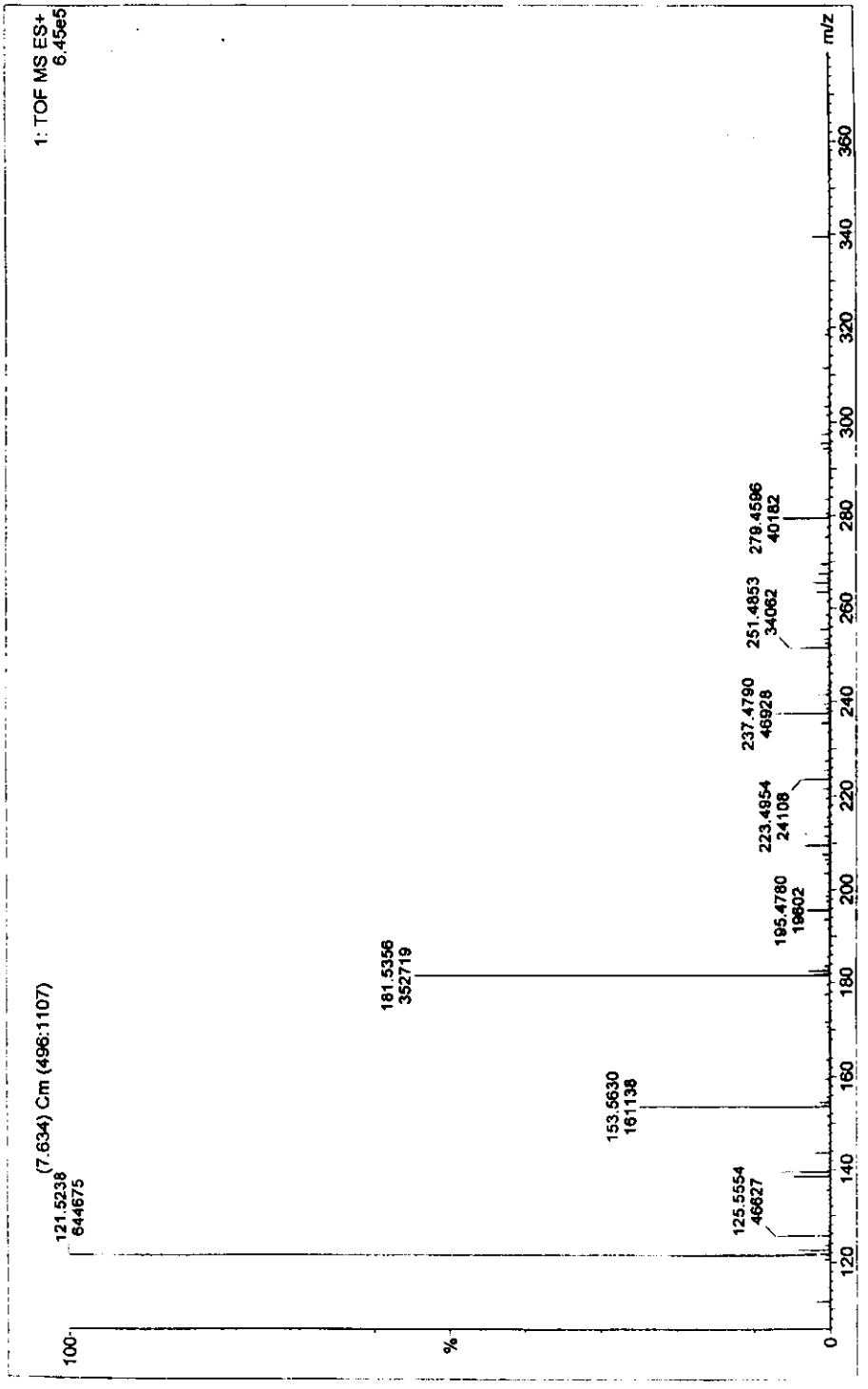

**รูปที่ 2.2** MS (m/z) ที่ 1.670 นาที



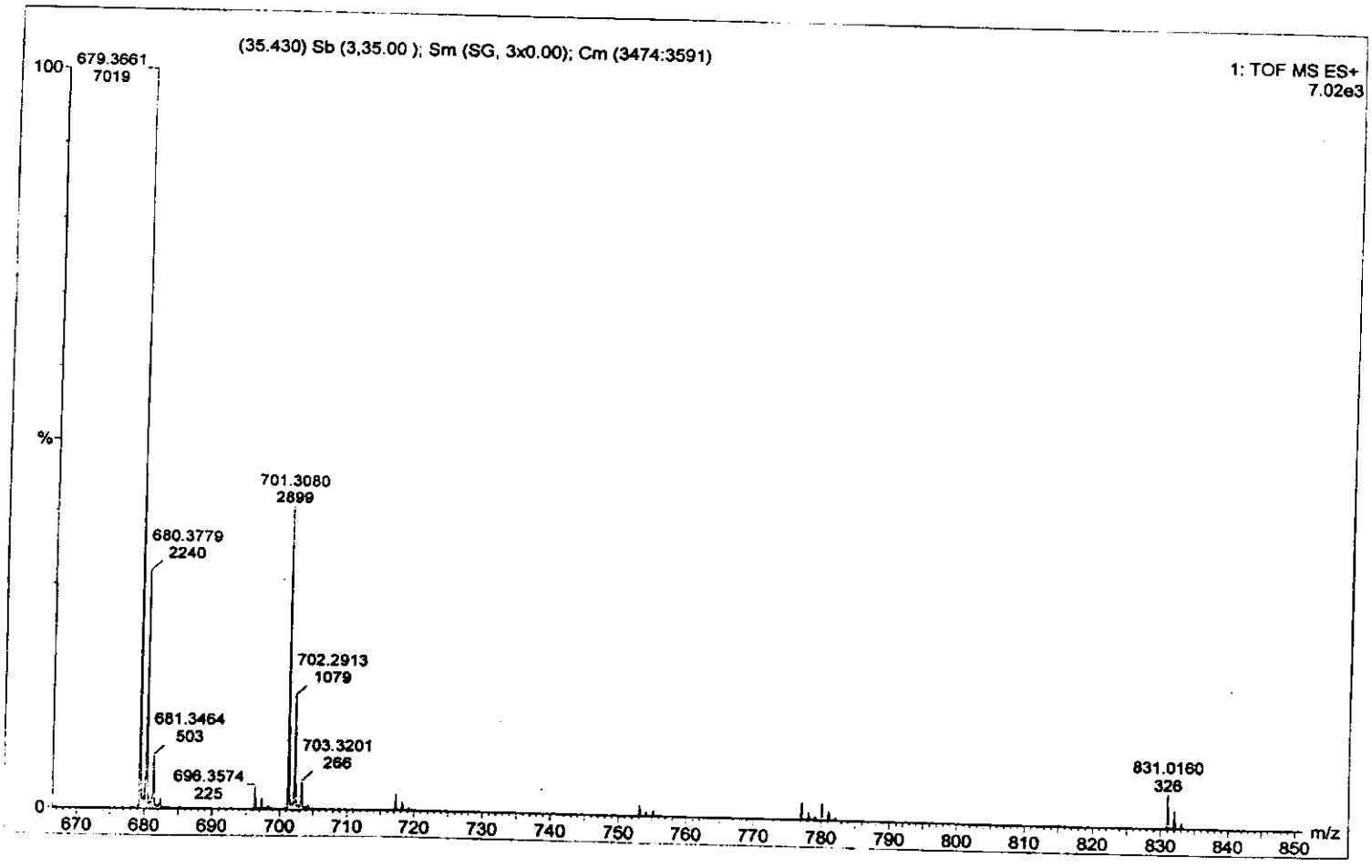

รูปที่ 2.3 MS (m/z) ที่ 1.670 นาที



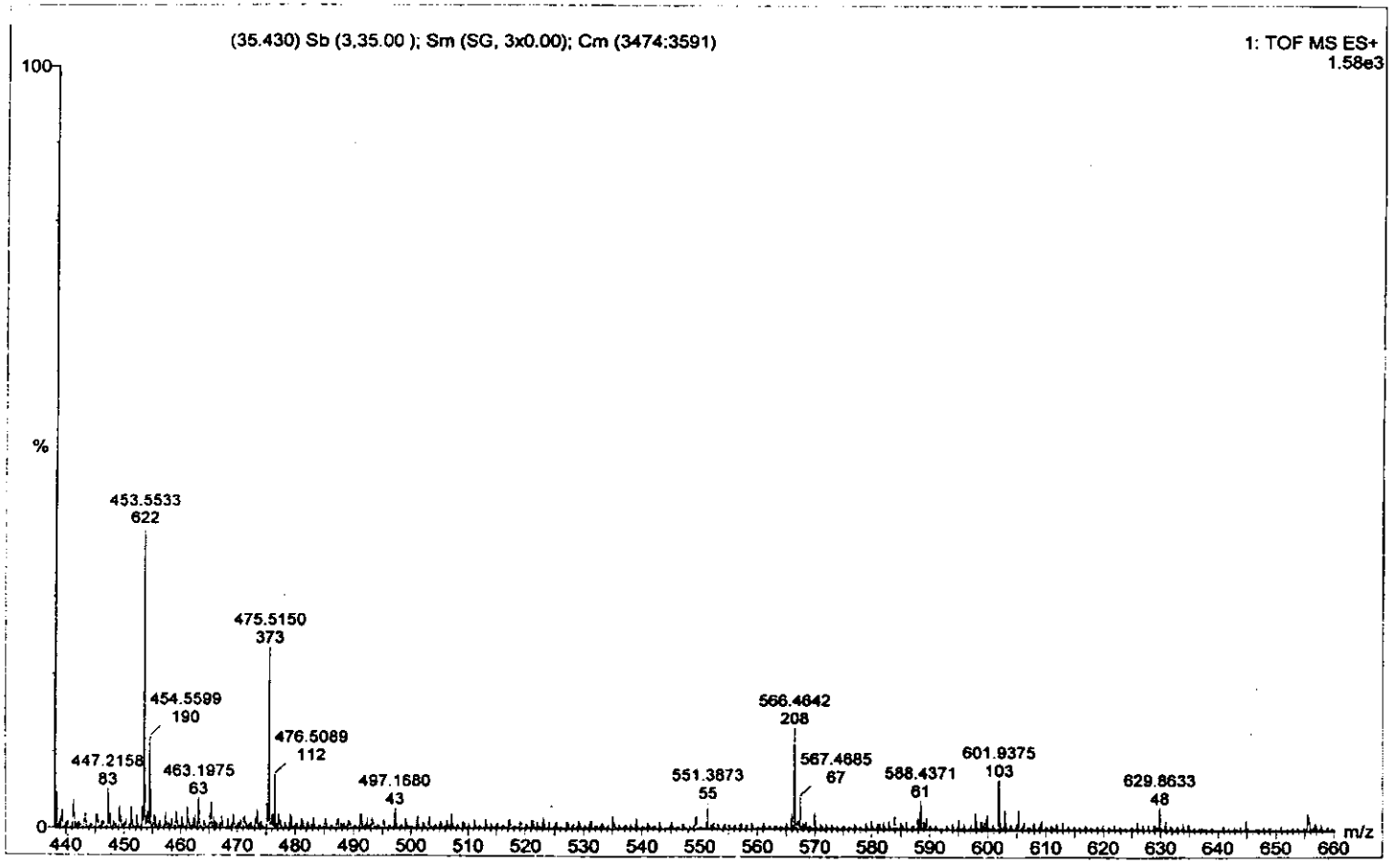

รูปที่ 3 MS (m/z) ที่ 2.101 นาที



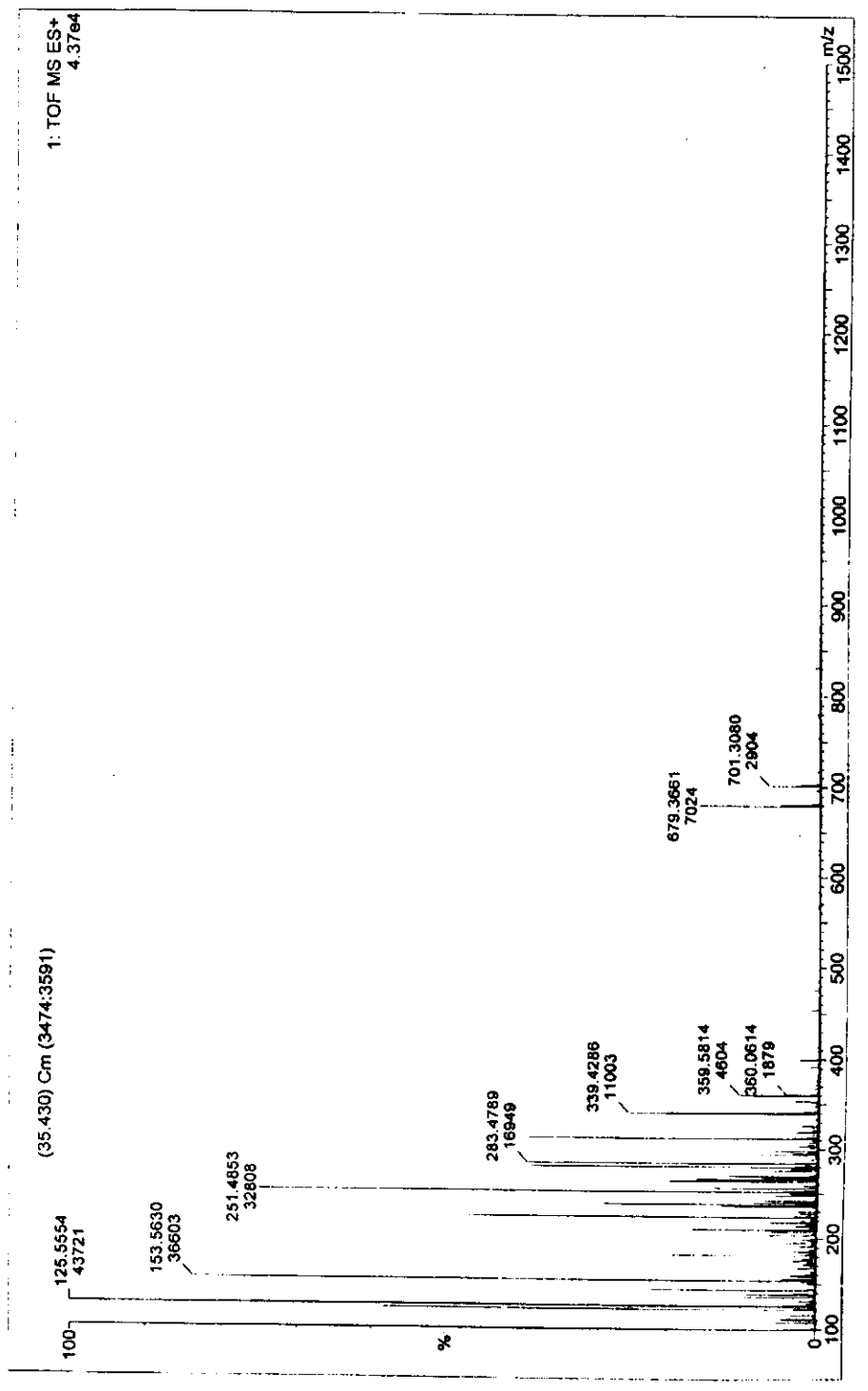

**รูปที่ 4** MS (m/z) ที่ 7.634 นาที



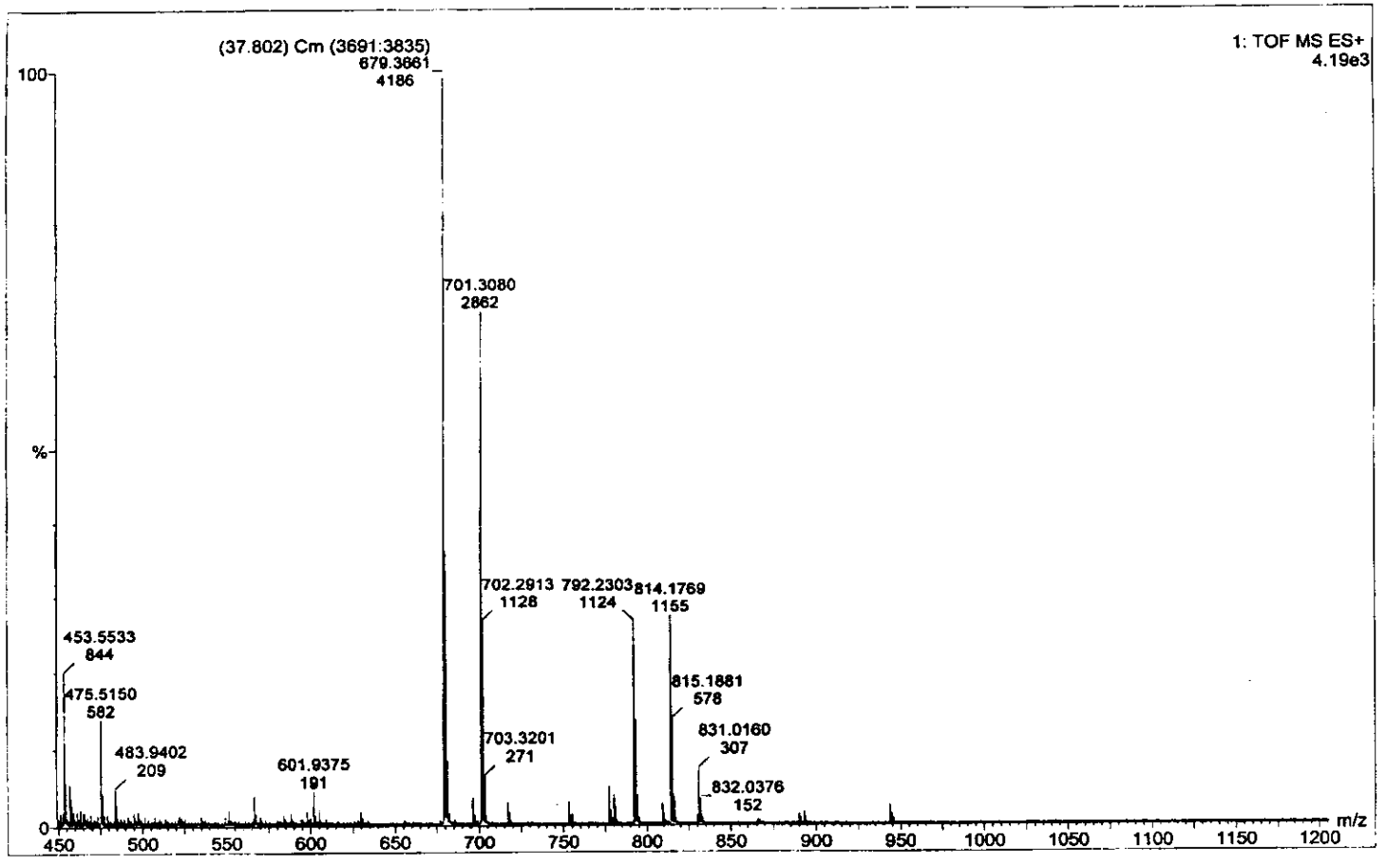

**รูปที่ 5.1** MS (m/z) ที่ 35.430 นาที



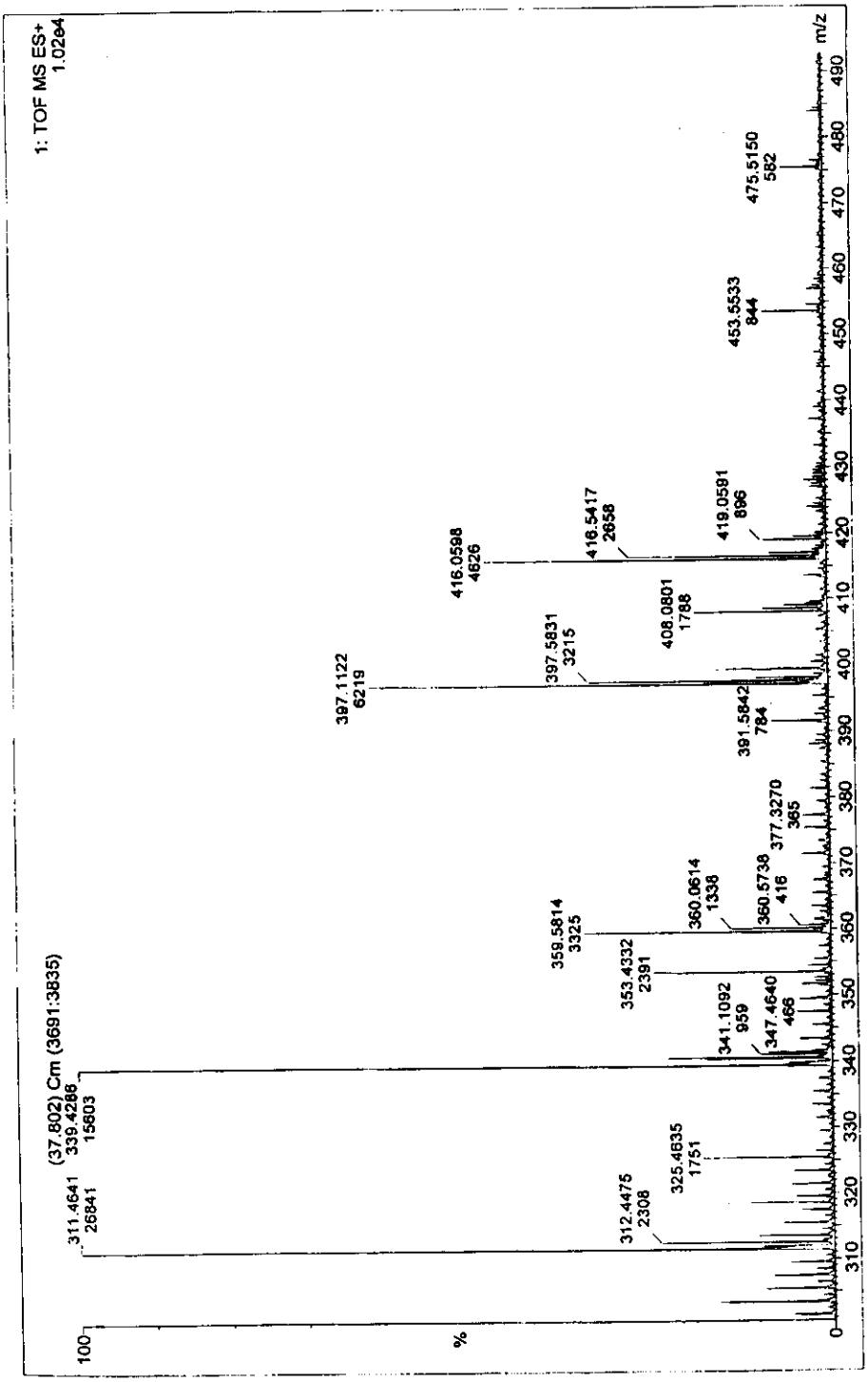

**รูปที่ 5.2** MS (m/z) ที่ 35.430 นาที



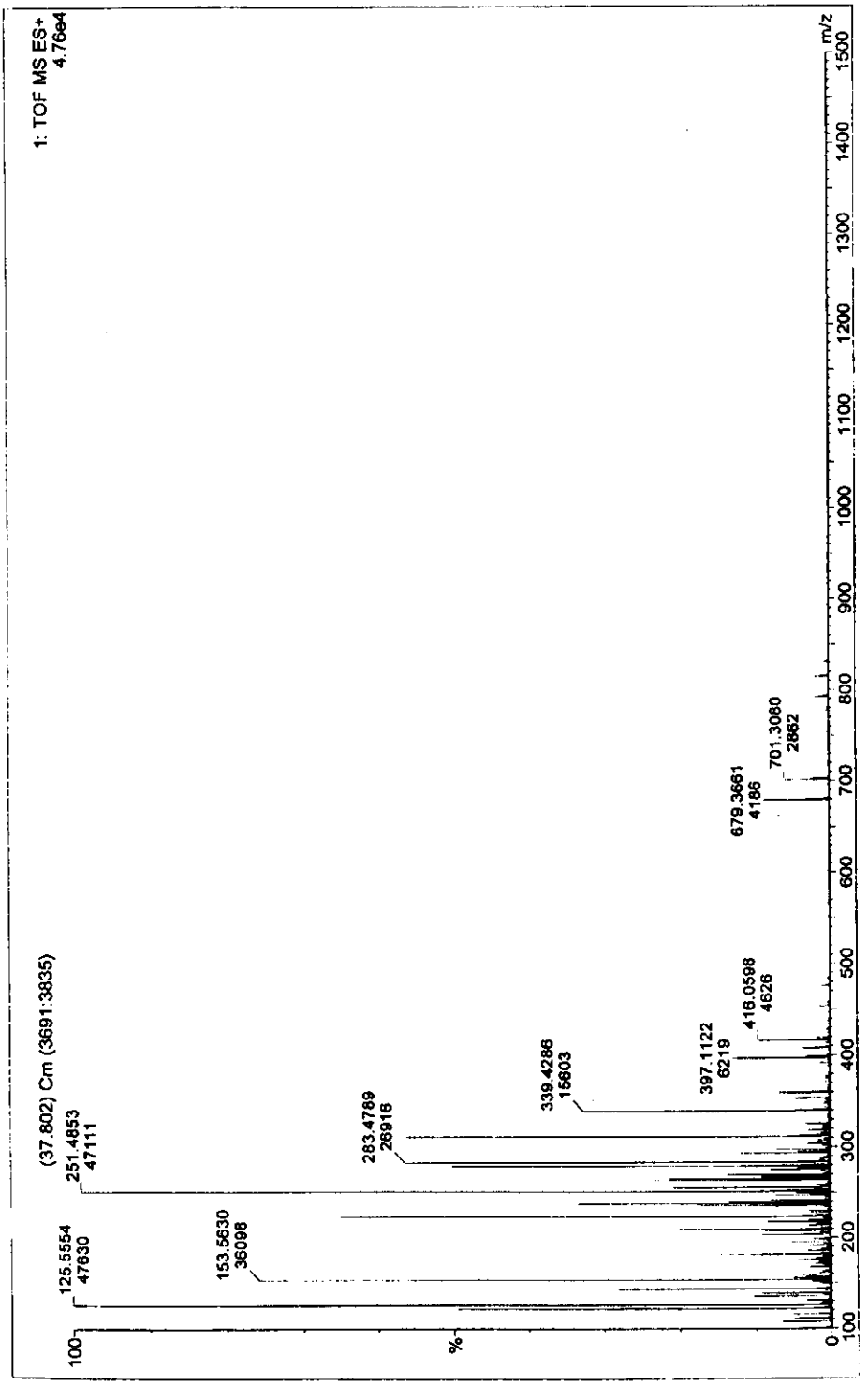

รูปที่ 5.3 MS (m/z) ที่ 35.430 นาที



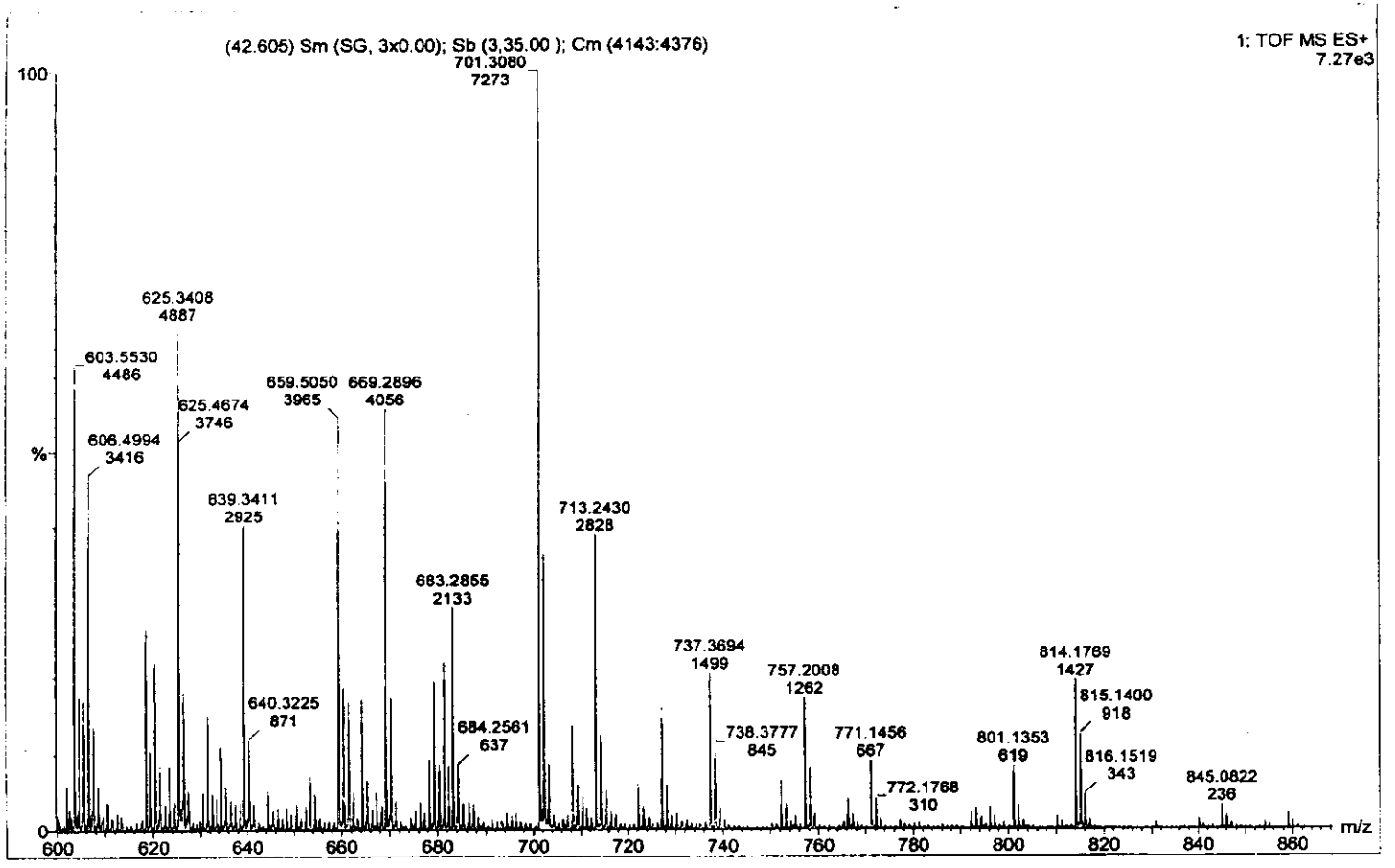

**รูปที่ 6.1** MS (m/z) ที่ 37.802 นาที



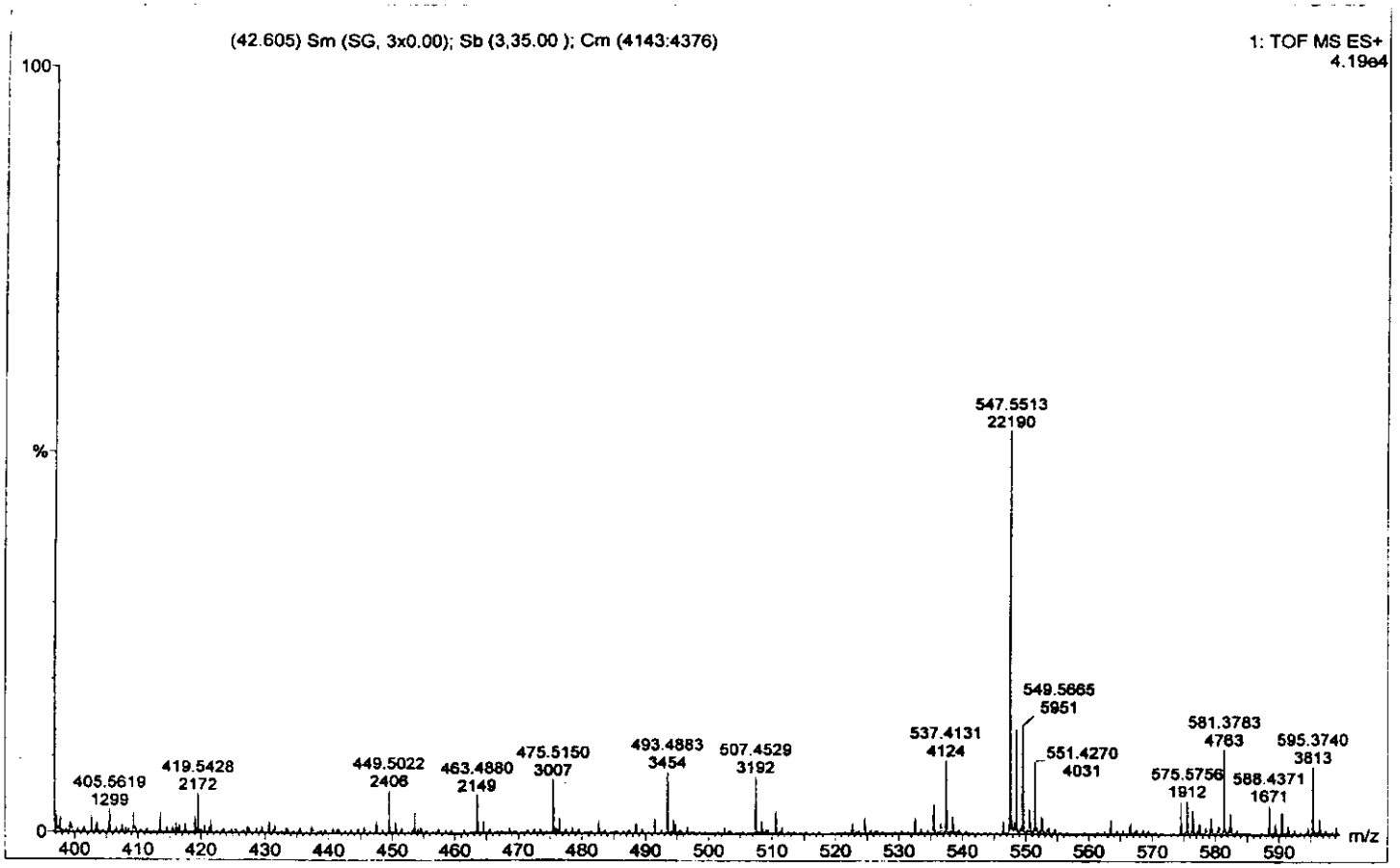

**รูปที่ 6.2** MS (m/z) ที่ 37.802 นาที



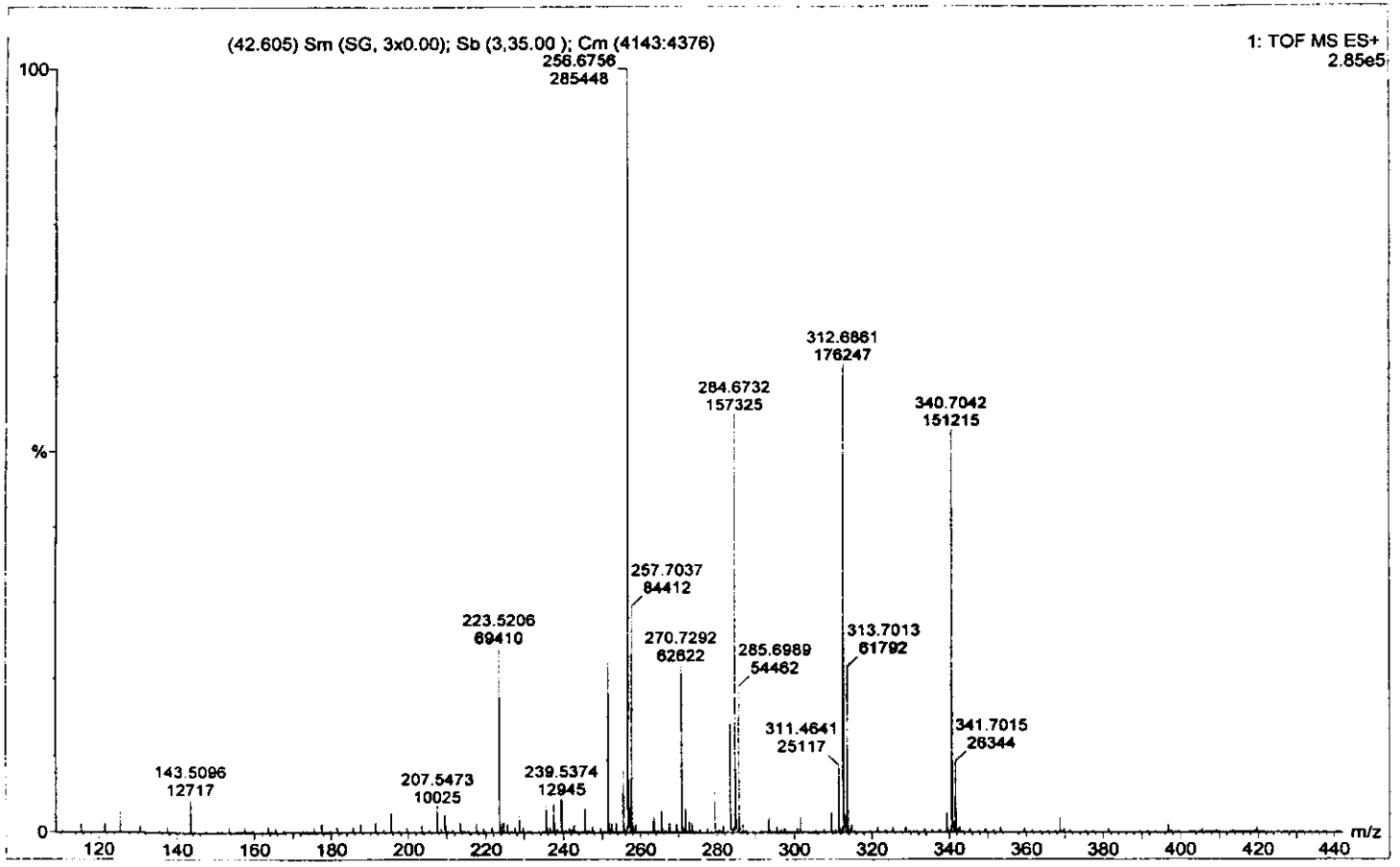

**รูปที่ 6.3** MS (m/z) ที่ 37.802 นาที



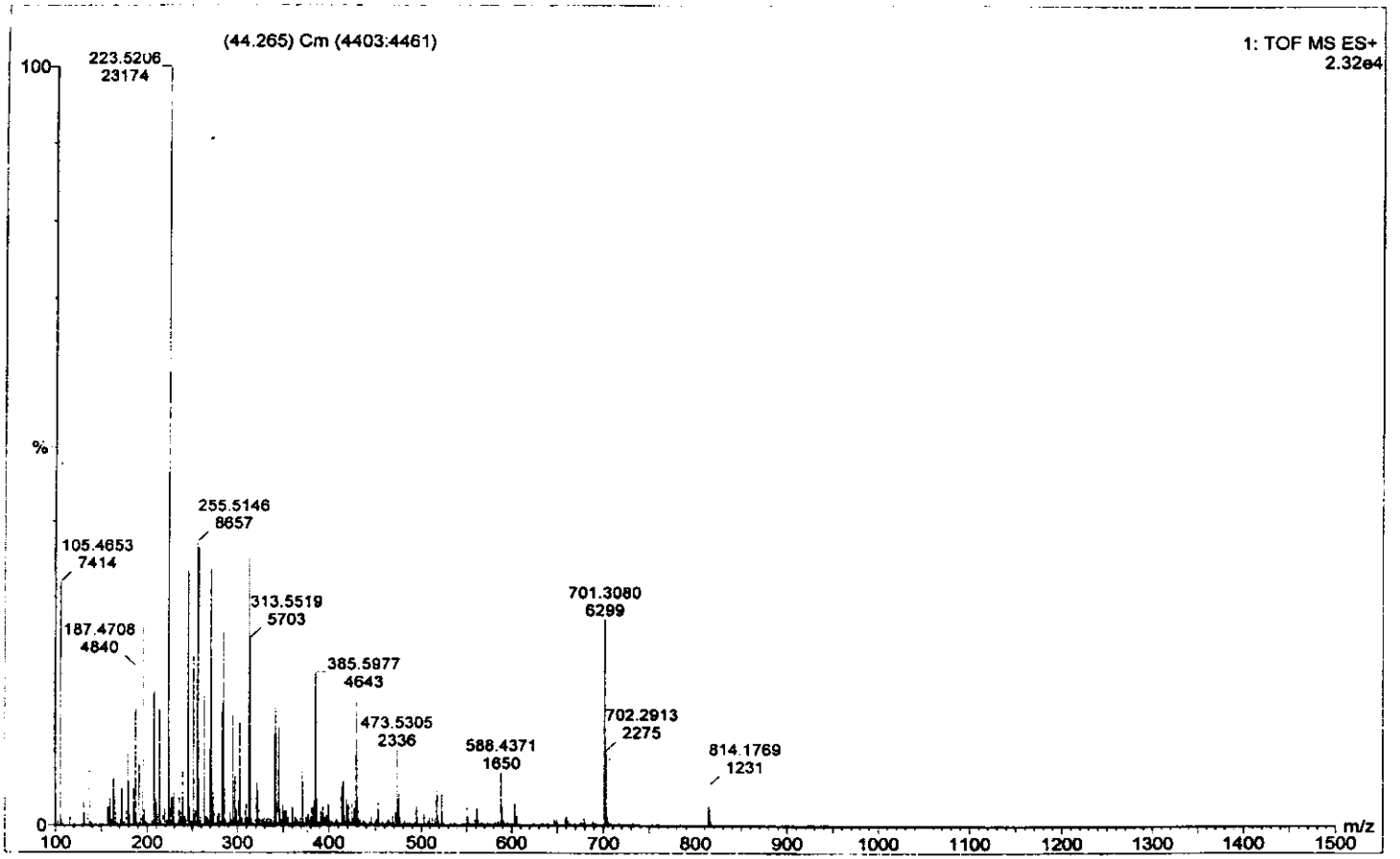

**รูปที่ 7.1** MS (m/z) ที่ 42.605 นาที



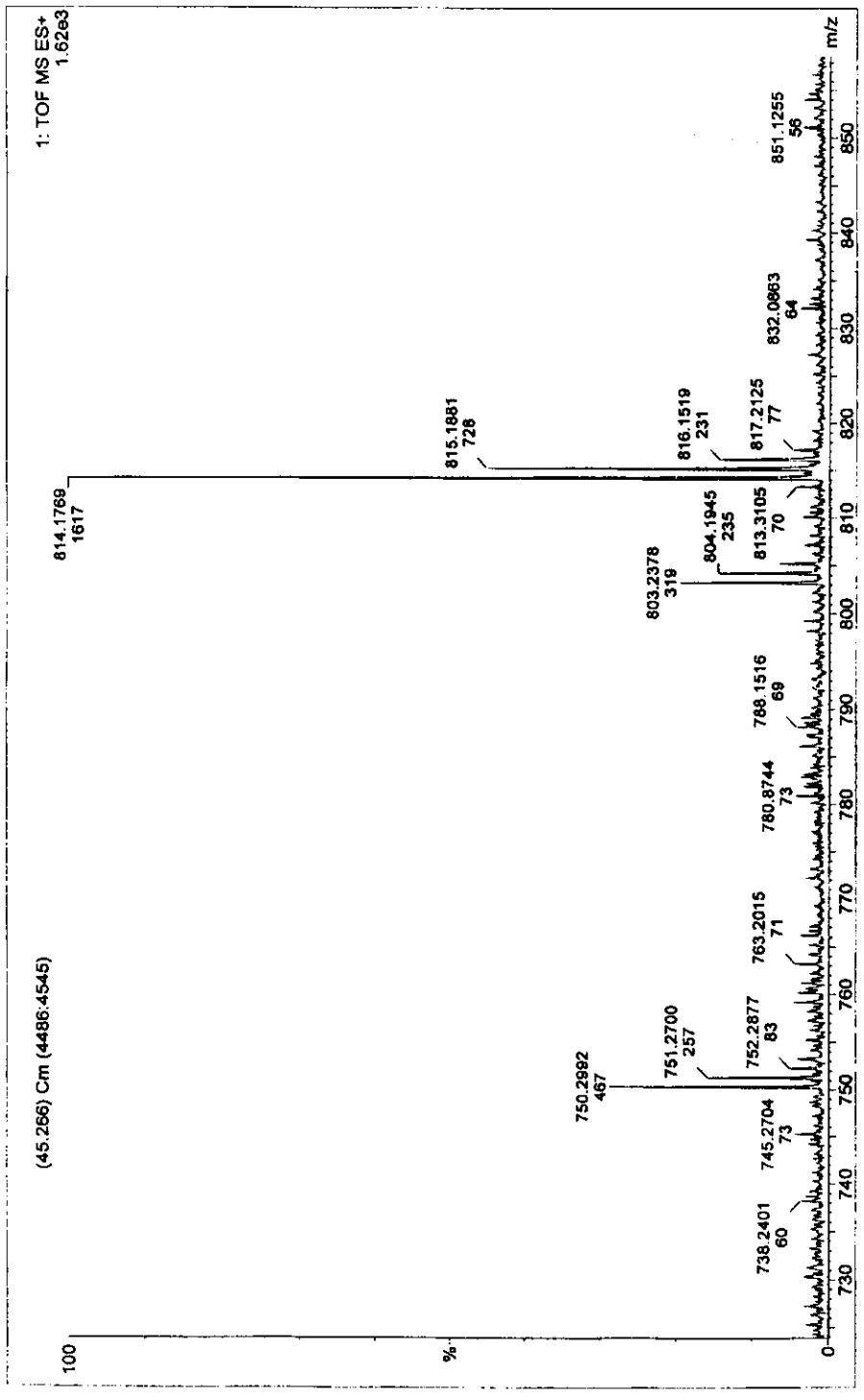

**รูปที่ 7.2** MS (m/z) ที่ 42.605 นาที



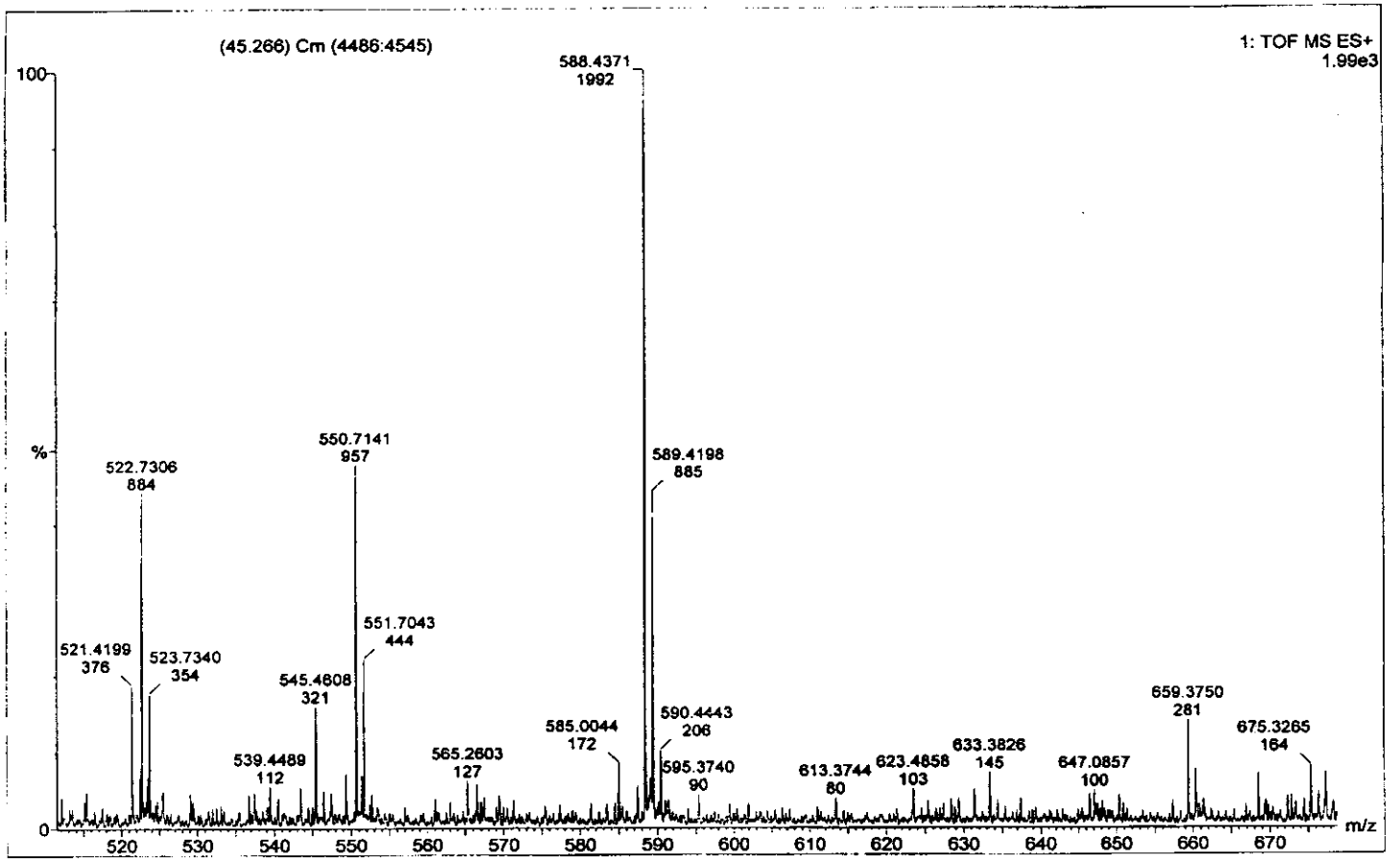

**รูปที่ 7.3** MS (m/z) ที่ 42.605 นาที



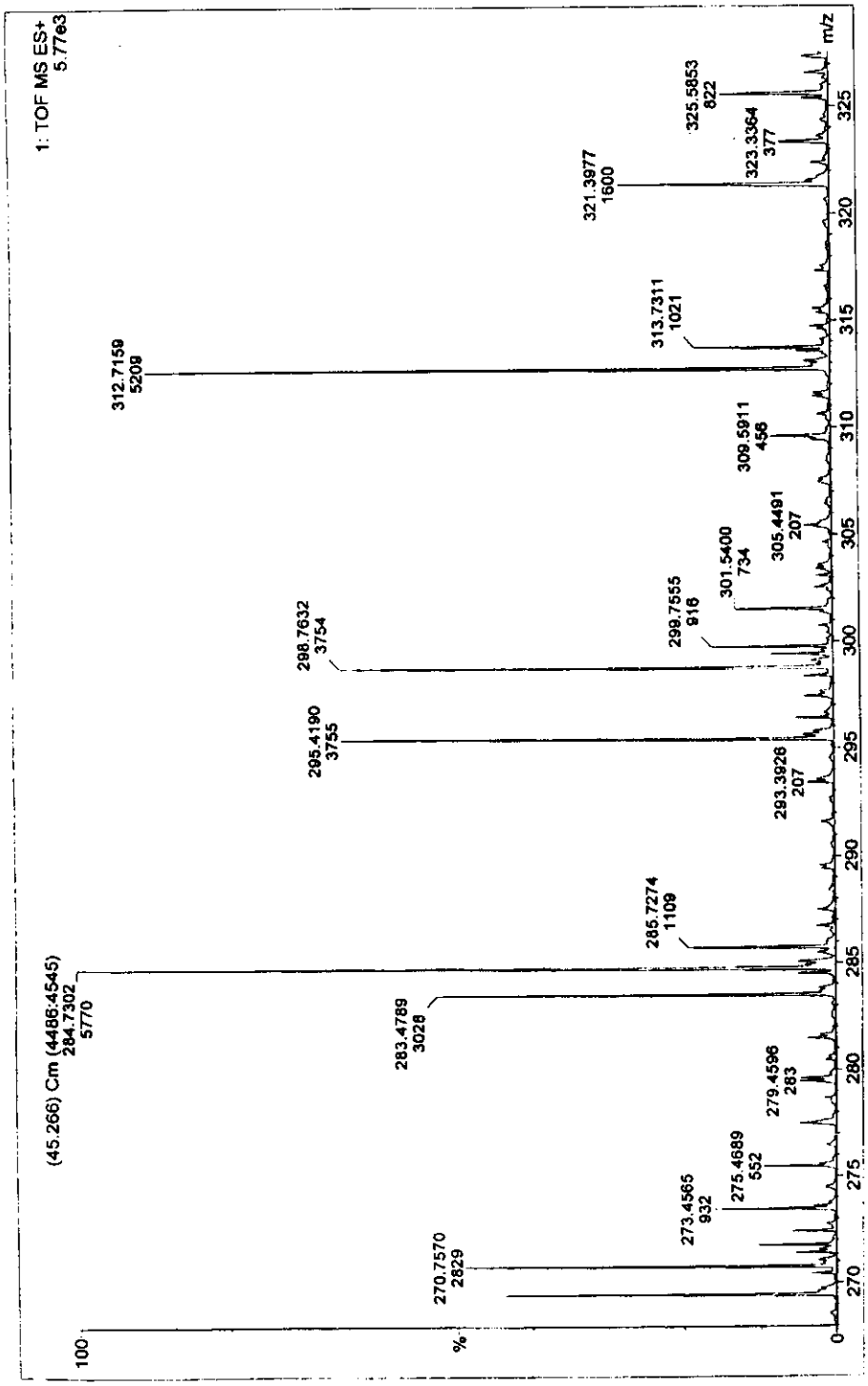

**รูปที่ 8** MS (m/z) ที่ 44.265 นาที



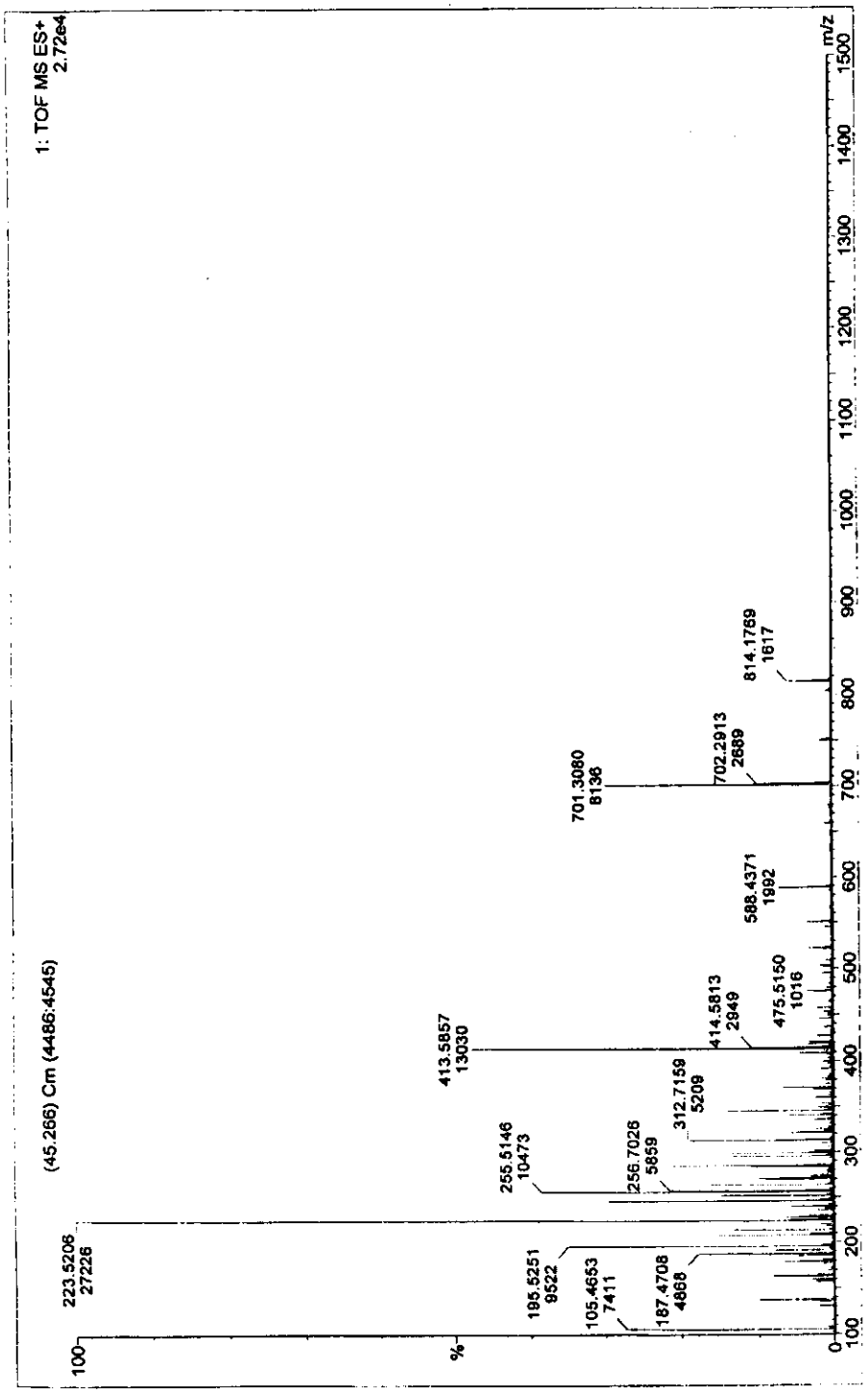

**รูปที่ 9.1** MS (m/z) ที่ 45.266 นาที



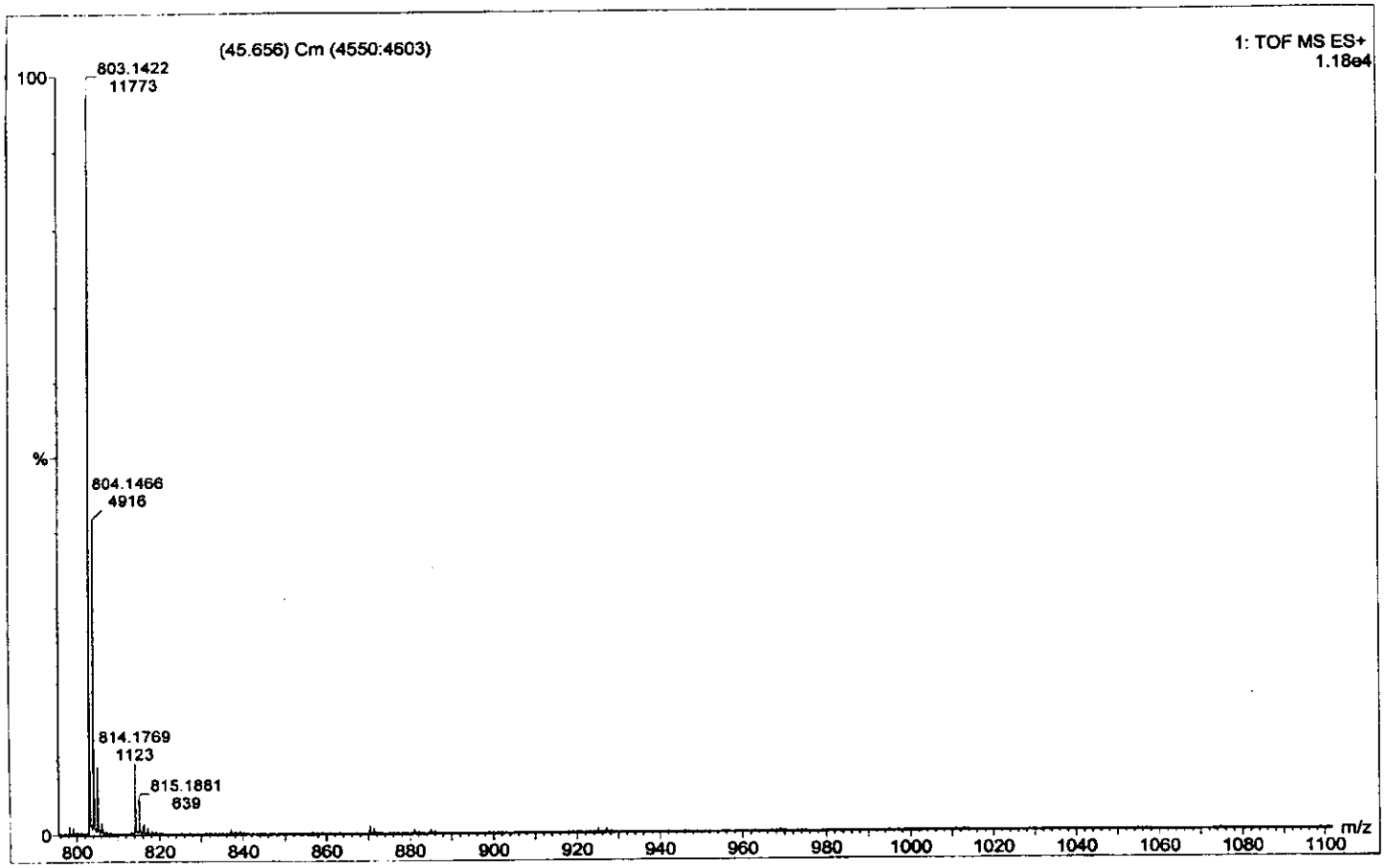

**รูปที่ 9.2** MS (m/z) ที่ 45.266 นาที



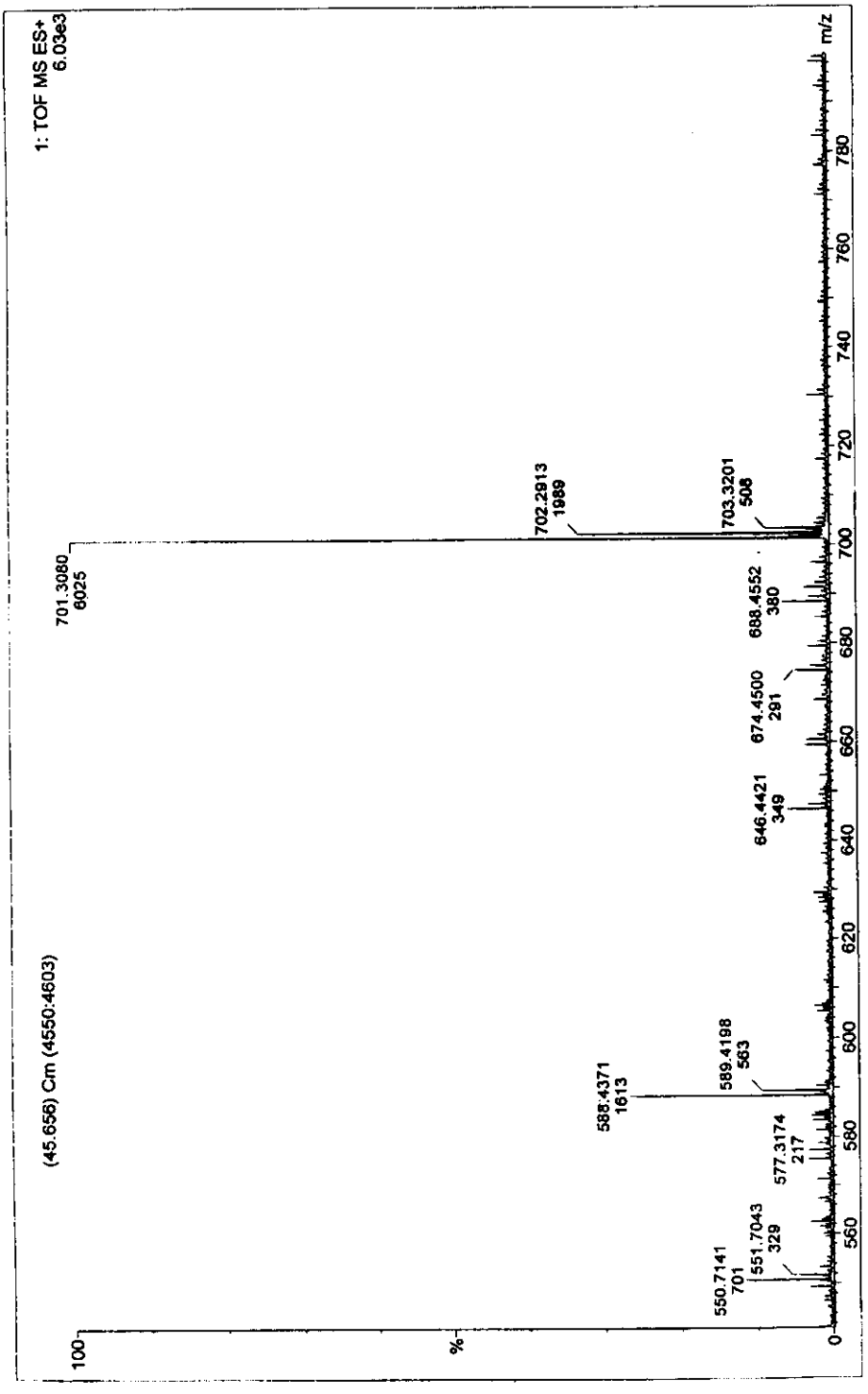

**รูปที่ 9.3** MS (m/z) ที่ 45.266 นาที



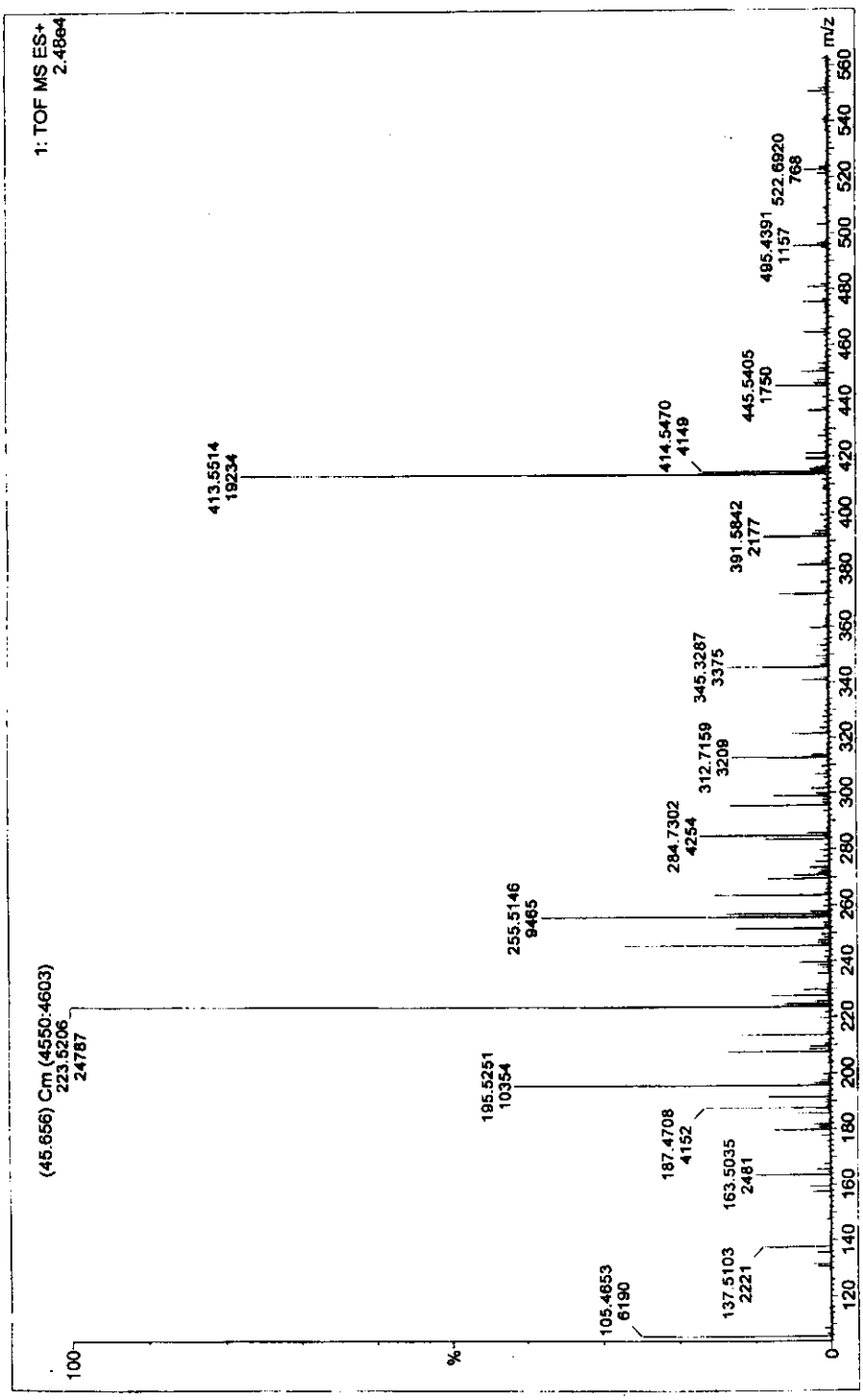

**รูปที่ 9.4** MS (m/z) ที่ 45.266 นาที




**รูปที่ 10.1** MS (m/z) ที่ 45.656 นาที




**รูปที่ 10.2** MS (m/z) ที่ 45.656 นาที




รูปที่ 10.3 MS (m/z) ที่ 45.656 นาที

# ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่จากวิทยานิพนธ์นี้

Voravuthikunchai S.P., Lortheeranuwat A., Jeeju W., Sririrak T., Phongpaichit S., Supavita T. 2004. Effective medicinal plants against enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. J. Ethnopharmacol. 94: 49-54.

Sririrak T., Supavita T., Pantong K., Voravuthikunchai S.P. 2004. Antibacterial activity of *Punica granatum* pericarp on pathogenic Gram-negative bacteria. Songklanakarin J. Sci. Technol (in press).